

⑤ Int. Cl<sup>2</sup>.

⑥ 日本分類

⑦ 日本国特許庁

⑧ 特許出願公告

C 12 D 13/04

36(2) D 73

昭51-36360

C 12 K 1/00

36(2) B 221.1

26(1) B 2

## 特 許 公 報

⑨ 公告 昭和51年(1976)10月7日

庁内整理番号 7349-49

発明の数 1

(全 5 頁)

BEST AVAILABLE COPY

1

2

## ④ プルランの製造法

① 特 願 昭 46-79413

② 出 願 昭 46(1971)10月11日

公 開 昭 48-44492

③ 昭 48(1973)6月26日

⑦ 発 明 者 加藤耿相

岡山市春暈町3の1の16

同 塩坂誠

岡山市洲崎305

⑧ 出 願 人 株式会社林原生物化学研究所

岡山市下石井1の2の3

⑨ 代 理 人 弁理士 後藤道生

## ⑥ 特許請求の範囲

1 オーレオバンデイウム属に属するプルラン生産菌株を、主たる炭素源として澱粉の部分加水分解物を含有する培地に培養し、その培養液より生成したプルランを分離精製することを特徴とするプルランの製造方法。

## 発明の詳細な説明

粘質多糖であるプルランは通常プルラン生産菌株を、炭素源として蔗糖、時にはぶどう糖を含む液体培地に通気培養して製せられているが、本発明に於ては蔗糖、ぶどう糖に代り、澱粉部分加水分解物を用いることにより経済的に且好収率で生産することを見出したもので、各方面に興味のあるプルランの利用開発を大いに促進拡大するものである。

プルランはぶどう糖の3量体であるマルトトリオースが $\alpha$ -1・6結合により反復結合した粘質多糖類で、水には非常に良く溶解して粘稠な溶液になる。その構造は比較的簡単である故、プルラン及びその誘導体の医学的又は工業的用途に大いなる興味を呼んでいる。

プルランはプルラン生産菌株の培養により得られる粘質物で、R. Bauerにより1938年に見出

され、1959年H. Bender等の研究 Biochim. Biophys. Acta 36 309(1959)により構造が明かになりその後の報告が多いが、何れも培養培地として蔗糖を用いている。蔗糖以外の炭素源を用いた研究は、上田誠之助 工業化学会誌 第67巻 757-760(1964)、二宮英治 農化 43 115-118(1969)等があるが、前者は培地として蔗糖の外グルコース、マルトース、マンノース、フラクトース等各10種単糖又は2種類に就いて比較しているがその収率は蔗糖より悪く20~28%である。後者に於てはグルコースの3%培地で63%の対糖収率があると述べているに過ぎず、蔗糖を培地として用いた時も多くは報告はその収率が12~28%であつて工業的生産に適するものではない。

本発明者等はプルランの微生物による工業的生産法を検討した。培地の炭素源として従来の蔗糖、グルコース以外の培地を比較研究した結果、オリゴ糖又はデキストリンを含有する澱粉部分加水分解物即ち水飴が非常に経済的であり、且従来の培地である蔗糖又はグルコースより非常に優れた結果を示すことを見出した。即ち炭素源として澱粉の酸又は酵素による部分分解物(分解率30-70)のオリゴ糖又はデキストリンを含む水飴を用いることにより70%以上の対糖収率を得ることに成功し、プルランの工業生産を可能にすることが出来た。

その方法について説明すれば、先づ利用するプルラン生産菌株はプルラン生産能を有する菌株であれば何れも本発明の実施に利用することができる。例えば、オーレオバンデイウム(Aureobasidium)属に属する Aureobasidium pullulans IFO 6401、Aureobasidium pullulans IFO 6402、Aureobasidium pullulans AHU 9553、Aureobasidium pullulans IFO 6353、Aureobasidium pullulans IFO 4464等多数の菌株があるが、

3

生産するプルランの使用目的により菌株を選び適当な重合度のプルランを得るように選択する。又、多くの菌株は色素を生産する故之も適当な菌株を選ぶべきである。生産色素による着色汚染は極力避けるべきである。

培地の炭素源とし水飴を用いるに当り、その原料澱粉は穀類澱粉であるコーンメイズスターチ、ワキシメイズスターチ、小麦澱粉、又は地下澱粉としてかんしよ澱粉、じやがいも澱粉、タピオカ澱粉等何れも使用可能である。

又粗澱粉である米粉、古米、白糖、コーングリツツ等も用いられるが、これら粗澱粉使用の場合は出来得る限り低温（50～70℃）で、 $\alpha$ -アミラーゼで液化し溶出し濾過精製後使用する。

精製澱粉の部分加水分解物としては酸加水分解又は酵素例えば $\alpha$ -amylase による加水分解物が適当である。その加水分解の程度即ちデキストロス・イクイバレント（以後DEと略称する）は、20～70の範囲で利用し得るがDE 35～60が好ましい。DE 20以下の分解物は未反応デキストリンを残すことがあり好ましくない。酸加水分解物の製法は、各種の精製澱粉乳に蔭酸又は塩酸を加えPH 2.0以下にて120℃以上に加熱し、適当なDEで反応液を冷却して炭酸石灰又は炭酸ソーダで中和した後、脱色しイオン交換精製等の方法で脱塩して製造する普通水飴の製法と変りはない。又酵素糖化物は同様な澱粉乳を酸で液化した後、 $\alpha$ -アミラーゼで60～70℃で糖化するか又は $\alpha$ -アミラーゼで液化糖化を行うことが出来る、前法の酸酵素二段糖化の場合はDEは50以上に上げ得られるが、酵素のみによる糖化では35位が限界である。又麦芽アミラーゼを用いる糖化法では酸又は $\alpha$ -アミラーゼにより液化後約50℃～70℃で麦芽酵素で糖化し、DE 50附近まで進めることが出来る。又イソアミラーゼと麦芽酵素の共用により麦芽糖の多い特殊水飴も製せられ利用せられる。何れも活性炭脱色、イオン交換精製し無色の澱粉部分加水分解物が得られる。

これら澱粉部分加水分解物が培地に用いられる濃度は3～30%の範囲であるが、プルランの収率から見て5～15%が好ましい。15%以上では培養時間が延び、残糖多く、一方5%以下ではプルランの有機溶媒による沈澱分離に多くの有機

4

溶媒を必要とする不利が伴う。プルランの対糖収率は糖濃度の増加と共に減少するが対液当りの収量は増加する。培地として必要な他の窒素源は通常使用せられる有機又は無機窒素が用いられ、又

5 無機塩類も公知の塩類が使用される。即ち磷酸カリ、食塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄等を用いる。

最初のPHは5.0～7.5で行い培養温度も通常の27℃～30℃位が適当である。所要培養時間は3～8日を必要とし残糖の無くなつた時収量も最

10 高になる。但し培養時間が延びると製品プルランの重合度は減少する傾向を示す故、目的により停止時間を決定する必要がある。通気に就いては特に注意することはない。培養終了後、加熱して酵素を失活させ、菌体を遠心分離で除去し、後メタ

15 ノール等の有機溶媒を等量以上加える時はプルランは沈澱する故これを集め、水に溶解して同様に溶媒沈澱を繰返して精製して後乾燥すればプルランの粉末が得られる。製品は白色粉末で、水には非常に溶解し易く粘稠な液を作る。

20 3.5デニトロサリチル酸による末端基定量法によれば平均重合度は約1000～3000である。プルナーゼにより分解すればペーパークロマトグラム上ではマルトリオースのみのスポットを与え、酸分解すればグルコースのみを与える故純

25 プルランである。  
今培地に用いる澱粉部分加水分解物の種類、濃度、分解率に就いてプルランの収率に及ぼす影響を実験結果により示せば次の表の通りである。

(1) 数種の菌株に対する炭素源の種類の影響

30 炭素源：蔗糖、グルコース

澱粉部分分解物（酸糖化水飴、酵素糖化水飴、マルトース（90%））

使用培地

炭素源	10.0	%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	%
NaCl	0.2	%
ペプトン	0.2	%
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.04	%
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	%

PH 7.5 500ml フラスコに100ml培地ロー  
タリーシェーカー温度 28℃

5

6

培養時間 7 日

対糖収率比較

	炭素源	A Aureobasidium pullulans AHU 9553		B Aureobasidium pullulans IFO 6353		C Aureobasidium pullulans IFO 4464	
在来炭素源	グルコース	35%		31%		43%	
	蔗糖	51%		35%		54%	
澱粉部分分解物	マルトース (90%)	52%		51%		61%	
	酸糖化水飴 DE 45	65%		76%		75%	
	酵素糖化水飴 (DE 35)	63%		63%		72%	

3 菌株は比較的収量が良好で白色のブルランが得られる。特にC菌株は収量が良い。何れの菌株に於てもグルコース蔗糖に比較して50~70%の増収である。

(2) 澱粉部分分解物のDEの差による対糖収率比較

C菌株に就いて(1)と同様条件で比較した。

DE	25	30	40	50	60	70
酸糖化水飴	45	53	68	76	75	58
酵素糖化水飴	47	58	65	—	—	—

DEは40~60が適当であることを示し、60以上はグルコース又はマルトースが主成分となるため対糖収率が減少する。低DEはデキストリン部分がブルランに合成されにくいため、残糖として培養後期まで残り収量が減少している。

(3) 炭素源の濃度のブルラン対糖収率%に及ぼす影響

基質濃度	5%	10%	15%	25%	30%
酸糖化水飴	65	75	73	55	50
酵素糖化水飴	63	72	70	60	54

酸糖化水飴はDE45のもの、酵素糖化水飴はDE40のものをを用いた。又使用菌株はC菌株を

用い、その他の培養条件は(1)と同一である。糖濃度5%以下では菌の生育に糖が消費される率が多くなり、15%以上では培養時間の延長と共に糖のブルランへの合成が止まるため収量の減少が見られる。

以上述べて来つた様にブルランは蔗糖培地を用いることなく澱粉部分分解物の如き経済的な培地により好収率で生産し得ることを見出したことは今後のブルランの工業的利用開発に貢献する処が大なるものがある。例えば、ブルランナーゼによるマルトトリオース、又はマルトトリイトール或は抗血液凝固剤、其他樹脂フィルム等の製造等今後期待されるものが大である。以下実施例に就いて

詳述する。

#### 実施例 1

ブルラン生産菌株としてAureobasidium pullulans IFO 4464を用いた培地は下記の通り炭素源として蔗糖、ぶどう糖、マルトース(90%純度)、酸糖化水飴(DE 45)、酵素糖化水飴(DE 40)、の何れか1種を用いた。

#### 培地組成

炭素源	10	%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	%
ペプトン	0.2	%
NaCl	0.2	%

BEST AVAILABLE COPY

7

8

 $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$ 

0.04 %

※して遠心分離した上澄液に3倍容のメタノールを

 $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$ 

0.001 %

添加して多糖質を沈澱させ、少量の水に溶解しメ

タノールによる沈澱を繰返し、メタノール洗滌後

上記組成の培地100mlを500mlフラスコに

乾燥して収量を測定した。得たプルランは白色粉

入れ、常法通り加熱滅菌後、斜面培養を2日行つ

5 末で、水によく溶け、プルラナーゼによりマルト

た菌株を種培養2日行い之を植菌して、27℃、

トリオースのみを生成する故プルランであること

PH 7.5で7日間ロータリーシェーカーにより振

を確認した。その結果は下表の通りである。

とう培養した。各時点での培養液をサンプリング※

炭 素 源	P H		濁度×10		残糖g/100ml			対糖収率%		
	3日	7日	3日	7日	3日	5日	7日	3日	5日	7日
ぶどう糖	4.2	4.8	0.8	1.5	5.8	3.2	0.5	21	32	43
蔗糖	4.2	4.2	0.7	1.4	5.1	1.2	0.3	30	45	54
マルトース	4.2	4.6	0.97	2.0	6.5	3.1	0.5	10	32	40
酵素糖化水飴 (DE40)	4.2	4.2	0.9	1.8	5.1	2.0	0.3	35	65	72
酸糖化水飴 (DE45)	4.2	4.4	0.9	1.9	5.5	1.8	0.1	38	67	75

註 上表の結果は2回の実験値の平均である。

上表の通り酸糖化又は酵素水飴の様なオリゴ糖の多い水飴に於ては非常に良い結果を示しマルトースは比較的悪い結果を与える。

## 実施例 2

プルラン生産菌株として *Aureobasidium pullulans* AHU9553を用い実施例1と同一培地を用いて同一条件で5日間培養した。その結

\*果は色素の生成は比較的少いがプルランの収率は前例に比して劣る。水飴を培地に用いたものは蔗糖、ぶどう糖よりも好結果が得られた。その結果

25 を下の表に示す。炭素源として酸、酵素二段糖化水飴DE46、を用いた。糖濃度は15%である。

培養結果

炭 素 源	ぶどう糖	蔗糖	マルトース	酸、酵素水飴 DE 46	酸糖化水飴 DE 43
残糖g/100ml	1.7	1.1	2.1	0.8	0.5
プルランの対糖収率%	35	51	52	63	65

## 実施例 3

プルラン生産菌株として *Aureobasidium pullulans* IFO6353を用いて実施例1と同様に5種の炭素源を用いて5日間培養した。本実施例の場合培養日数が少い為収率は少々減少したが、炭素源として澱粉部分加水分解物を基質としたものは蔗糖、ぶどう糖に比較して20~30%の好収率を示した。得られた製品は着色の少ない粉末で冷水に良く溶解して、プルラナーゼによる

分解物をベーパークロマトグラムで検討した結果マルトトリオースのみのスポットが得られ、プルランに間違いなくその粘度は前2例よりも小である。

## 実施例 4

プルラン生産菌株として *Aureobasidium pullulans* IFO6402を用い実施例1の培地に炭素源として酸糖化水飴のDE 35%のものを濃度15%で27℃、8日間振とう培養し

9

た。培養終了、残糖の皆無なことを確めた後、加熱し酵素を失活させ、除菌後培養液の3倍のメタノールを加え、生じた沈澱を分取再び水に溶解、メタノール沈澱を繰返し精製乾燥しプルランを得た。原料糖の70%収率であつた。

得たプルランを10%溶液となしエーロバクターエーロゲネスATCC 8724より得たプルランゼ塩析品を200単位加えPH.6.0 45℃で40時間分解した。反応液を活性炭脱色イオン交換脱塩し濃縮して無色の製品シロップを得た。10

10

## -実施例 5

実施例4にならい水飴から精製マルトトリオースを得、これを30%水溶液となしオートクレーブに注入し炭酸カルシウム0.3%加え、触媒としてラネーニッケルを固形分の10%添加して水素ガス100kg/cm<sup>2</sup>で攪拌しつゝ徐々に温度をあげて100℃で止めた。濾過によりNiを除去してイオン交換樹脂で脱塩脱色し濃縮すれば無色のシロップを得る。本シロップから結晶化、分蜜も容易である。還元性なく、加水分解によりグルコース：ソルビトール2：1の値が得られ、安定したマルトトリイトールであることを確めた。収率は96%理論量に近い。

BEST AVAILABLE COPY

Excerpt Translation of Japanese Patent Kokoku No. 36,360/76

Translation of page 1, left column, lines 15 to 20

"CLAIM:

1. A process for producing pullulan, comprising the steps of culturing a microorganism capable of producing pullulan of the genus *Aureobasidium* in a culture medium comprising a partial starch hydrolyzate as a main carbon source; and separating and purifying the produced pullulan from the culture."